

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

B53

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01134243 A**

(43) Date of publication of application: 26.05.89

(51) Int. Cl.

G01N 27/30**G01N 27/46**

(21) Application number: 62292323

(22) Date of filing: 19.11.87

(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**

(72) Inventor: **KAWAGURI MARIKO
FUJITA MAYUMI
NANKAI SHIRO
IJIMA TAKASHI
SUETSUGU SACHIKO
KOMATSU KIYOMI
MORIGAKI KENICHI
KOBAYASHI SHIGEO**

(54) **BIOSENSOR**

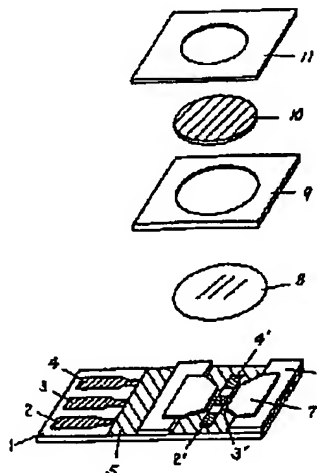
(57) Abstract:

PURPOSE: To easily and quantitatively determine even a sample having high viscosity with high accuracy by providing a water-absorptive high polymer layer on the surface of an electrode system, providing a filter layer and a guide layer for liquid on the electrode system and integrating them with a porous body.

CONSTITUTION: The electrode system consisting of a counter electrode 2, a measuring electrode 3, and a reference electrode 4 is formed on an insulating substrate 1 and then an insulating layer 5 is formed covering the electrode system partially except parts 2'W4' which operate electrochemically. A cellulose water-absorptive high polymer layer is provided on the surfaces of electrode systems 2'W4', a groove is formed on the electrode systems with both-sided adhesive tapes 6, and a couple of cellulose tapes are installed thereupon across the electrodes to form guide layers 7. Then a polycarbonate porous film 8 is adhered on a holding frame 9 and fixed with the both-sided adhesive tape 6 while covering the electrodes 2'W4', thereby forming the filter layer 8. Further, a porous body 10 is placed at the hole part of the holding frame 9 and a resin-made cover 11 which has a hole part having a

diameter smaller than the porous body is adhered to integrate the entire body.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio



⑫ 公開特許公報(A)

平1-134243

⑤ Int.Cl.⁴G 01 N 27/30
27/46

識別記号

庁内整理番号

J-7363-2G
M-7363-2G

④ 公開 平成1年(1989)5月26日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 バイオセンサ

⑰ 特 願 昭62-292323

⑱ 出 願 昭62(1987)11月19日

⑲ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	藤 田 真 由 美	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	飯 島 孝 志	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	末 次 佐 知 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	小 松 き よ み	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	森 垣 健 一	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	小 林 茂 雄	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑳ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
㉑ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外1名	

明 細 書

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

- (1) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性基板を備え、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度の変化を電気化学的に測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に吸水性高分子層を設け、電極系を前後からはさんだ位置に凸形状で測定極との距離が一番短くなるように一対の誘導層を設置し、前記電極系を覆う様に透過膜と多孔体を設け、前記各要素を一体化したことを特徴とするバイオセンサ。
- (2) 吸水性高分子が、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系からなる群のいずれかもしくはそれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡易に定量することのできるバイオセンサに関する。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などの操作を行なうことなく高精度に定量する方式としては、第5図に示す様なバイオセンサを提案してきた(例えば特開昭61-294351号公報)。

このバイオセンサは、絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対極2、測定極3、参照極4からなる電極系を形成する。次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'、3'、4'を残す様に絶縁性ペーストを前記同様印刷し、加熱処理して絶縁層5を形成する。次に、穴をあけた樹脂製の保持枠6を絶縁層5に接着し、前記電極系2'、3'、4'を覆

う様に多孔体10を穴の中に保持し、さらに多孔体より小さい径の開孔部を有する樹脂製カバー11を接着し、全体を一体化する。上記多孔体には、酸化還元酵素と電子受容体が担持されており、基質を含む試料液を多孔体に添加すると、酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。酵素反応が終了した後、この還元された電子受容体を前記電極で電気化学的に酸化し、この時得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

発明が解決しようとする問題点

この様な従来の構成では、尿や血清の様な低粘度のサンプルでは、微量を添加するだけで基質濃度が精度よく短時間で測定できるが、全血のように、血球が混在すると、電極表面に血球が付着して応答が大きく低下し、さらに高粘度のため、酵素反応が遅く、5分以上反応終了までに時間がかかり測定値がばらついた。

本発明は、これらの点について種々検討した結果、電極系の表面に吸水性高分子層を設け、さらに電極系の上に戸過層および液の誘導層を設けて

しかも、誘導層が測定極に最も近くなるように設置されているため、試料液は戸過された後、誘導層に導かれて最初に測定極をぬらし、電極表面の吸水性高分子層の助けもかりて電極系上にひろがるため、測定極上へアワが形成されたり、蛋白質が吸着するのを防ぎ、精度の良い測定が可能となった。

実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図は、グルコースセンサの一実施例について示したもので、構成部分の分解図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、100℃で1時間加熱乾燥することにより、対極2、測定極3、参照極4からなる電極系を形成する。次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'、3'、4'(各1mm²)を残す様に、絶縁性ペーストを前記同様印刷し、加熱処理して

多孔体とともに一体化することにより、血液のようを高粘度のサンプルでも容易に高精度に定量することができるディスポーザブルタイプのバイオセンサを提供するものである。

問題点を解決するための手段

本発明は上記問題点を解決するため、絶縁性基板に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、試料液中の基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に吸水性高分子層を設け、電極系を前後からはさんだ位置に凸形状で測定極との距離が一番短くなるように誘導層を設置し、さらに電極系を覆う様に戸過膜と多孔体を設け、前記各要素を一体化したものである。

作用

本発明によれば、戸過膜と誘導層を設けたことで全血のような高粘度の試料も精度よく迅速に測定でき、試料液を多孔体に添加することにより、極めて容易に基質濃度を測定することができる。

絶縁層5を形成する。

この電極系2'、3'、4'の表面をセルロース性の吸水性高分子の1種であるCMC12(カルボキシメチルセルロース)の0.5%水溶液を10μl塗布し、45℃で30分乾燥した。その上に、酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ13を10mMリン酸緩衝液(pH5.6)で溶かし、5μl滴下し自然乾燥した。

次に、第1図に示す様に、両面接着テープ6で電極系上に溝を作り、この溝前後のテープ6上に電極を両側からはさむ様にセルロースのテープを一对設置する。この一对のセルロースのテープは第1図の様に凸部を持った略台形状で、両者の距離は測定極の所が一番短くなるように設置し誘導層7とする。次に、穴をあけた樹脂製の保持枠9に孔径1mmのポリカーボネート多孔体膜8を接着し、前記電極系2'、3'、4'を覆う様に両面接着テープ6で固定し、戸過層とする。さらに、保持枠9の開孔部に多孔体10を置き、多孔体より小さい径の開孔部を有する樹脂製カバー11を接

着して全体を一体化する。多孔体10は、ナイロン不織布に電子受容体としてフェリシアン化カリウムをpH5.6のリン酸緩衝液に溶解した液を含浸後、減圧乾燥して作製したものである。この一体化されたバイオセンサについて、測定極3に沿った断面図を第2図に示す。

上記の様に構成したグルコースセンサの多孔体10へ試料液としてグルコース標準液を20 μ l滴下し、2分後に参照極4'を基準にして測定極3'の電位をアノード方向へ+0.5Vパルス電圧を印加し5秒後の電流を測定する。この場合、添加されたグルコース標準液により多孔体10に担持されたフェリシアン化カリウムが溶解する。逕過層8を通過した後、電極系を前後からはさむ様に置かれた誘導層7によりまず測定極3'から電極系上へ液が達し、CMC12上のグルコースオキシダーゼ13と反応して、グルコース濃度に応じたフェロシアン化カリウムが生成する。そこで、上記のパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得られ、

ゼ13と反応させることができた。しかし、液の広がり方が、参照極4'や対極2'が先にぬれて、測定極3'上に気泡が残る、低い応答になる場合があった。そこで、セルロースのテープの形状を種々検討した結果、第1図に示す様に、測定極3'上に凸部がくる様に設置すると、まず、測定極の所がぬれて両側の電極へと液が広がるため、気泡が残ることなく精度よく測定ができる様になった。その形状は、第1図に制限されず、第3図、第4図の様なアーチ状あるいは三角形状に突き出た凸部でも有効であった。セルロースのかわりに、レーヨンやパルプなど親水性の多孔体が使用できるが、厚みが数 μ mで液を保持しないものにすれば、わずかの逕過液でも有効に電極へ供給できる。

電極表面にCMCを塗布することにより、電極のぬれ性を向上させ、試料中の蛋白質等が電極表面へ付着するのを阻止し、再現性の良い応答が得られた。吸水性高分子として、ゼラチンやメチルセルロースなども使用できる。カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビ

基質であるグルコース濃度に対応する。グルコース濃度が700mg/dlまで良好な直線性が得られた。

上記のグルコースセンサに血液サンプル20 μ lを滴下し2分後の応答電流を測定すると、非常に再現性の良い応答が得られた。ポリカーボネート多孔体膜8を除いたグルコースセンサでは、血球が電極上へ付着し応答が著しく低下した。孔径1 μ mのポリカーボネート多孔体膜を逕過膜として用いると、血球の逕過が可能となるが、それだけでは電極上に短時間に液を供給するのは困難であり、血液によっては2分で液がこない場合もみられた。そこで、電極系上へ液を導くため誘導層として、セルロースのテープを電極の両側に設置した。血液を滴下すると、まずポリカーボネート多孔体膜8とセルロースのテープ7の接触面から逕過液が浸透して、わずか30秒で電極系上へ液が供給された。さらに、電極系の表面にCMC層12があるため、ぬれ性が向上し、わずか3 μ lの逕過液でも電極系上にひろがり、グルコースオキシダー

ニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。

本発明のバイオセンサにおける一体化の方法としては実施例に示した枠体、カバーなどの形や組み合わせに限定されるものではない。又、酸化還元酵素と電子受容体の組み合わせも前記実施例に限定されることなく、発明の主旨に合致するものであれば用いることができる。一方、上記実施例においては、電極系として3電極方式の場合について述べたが、対極と測定極からなる2電極方式でも測定は可能である。

発明の効果

このように本発明のバイオセンサは、絶縁性基板、電極系、誘導層、逕過膜、多孔体を一体化することにより血液の様な高粘度の試料でも、微量添加するだけで迅速で精度良く基質濃度が測定することが可能となった。

4、図面の簡単な説明

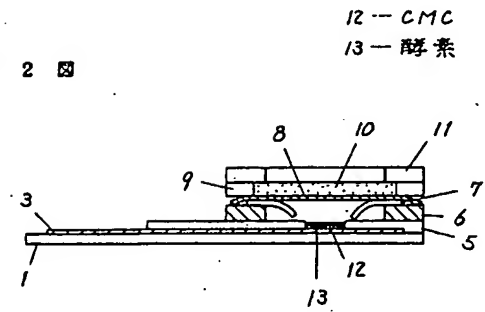
第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第2図はその縦断面図、第3図と

第4図は誘導層の別な例を示すバイオセンサの電極上の拡大模式図、第5図は従来のバイオセンサの分解斜視図である。

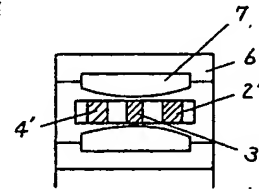
1……基板、2……対極、3……測定極、4……参照極、5……絶縁層、6……両面接着テープ、7……誘導層、8……濾過層、9……保持枠、10……多孔体、11……カバー、12……CMC、13……酵素。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

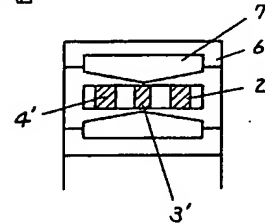
第 2 図



第 3 図

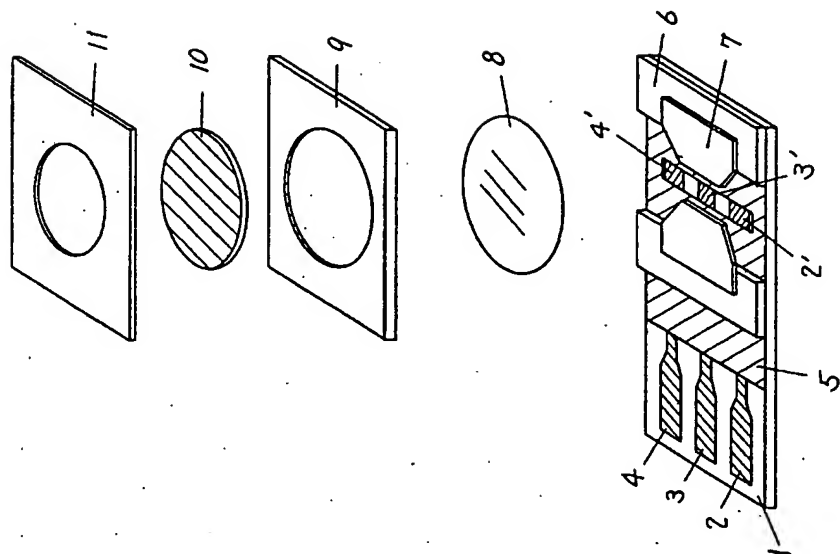


第 4 図



1……基板
2……対極
3……測定極
4……参照極
5……絶縁層
6……両面接着テープ
7……誘導層
8……濾過層
9……保持枠
10……多孔体
11……カバー

第 1 図



第 5 図

